Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 15, No. 4, Oct- Nov 2019, p. 441-452

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 15، شماره 4، مهر - آبان 1398، ص. 452-441

تاثیر چندگونه مخمر بر کاهش آفلاتوکسین B1 *آسپرژیلوس فلاووس* در مدل شبیه‌سازی شده معده انسان

سحر بهراموند[1]- صدیقه محمدی[2]*

تاریخ دریافت: 1397/05/23
تاریخ پذیرش: 1397/12/25

چکیده

آفلاتوکسین B1 یکی از متابولیت‌های ثانویه گونه‌های خاصی از قارچ آسپرژیلوس است که بسیار سرطان‌زاست. اخیراً استفاده از میکروارگانیسم‌ها جهت کاهش جذب مایکوتوکسین‌ها در دستگاه گوارش افزایش یافته است؛ لذا در این پژوهش اثر سه گونه مخمر *ساکارومایسس سرویزیه*، *پیچیا فرمنتانس* و *رودوتورولا موسیلاژینوزا* بر کاهش آفلاتوکسین B1 در محیط شبیه‌سازی شده معده مورد بررسی قرار گرفت. ابتدا قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* از دانه ذرت جداسازی و خالص‌سازی شد. سپس تولید توکسین در محیط کشت PDB زیر نور UV با تابش فلورسانس آبی تأیید شد. توکسین به روش حلالیت در کلروفرم استخراج و تزریق گردید و غلظت آن توسط دستگاه HPLC، 0/49 ng/ml تعیین شد. محیط معده به غلظت‌های تهیه شده از سم 0/1 میلی‌لیتر از آفلاتوکسین B1 در غلظت‌های 0/25 و 0/5 نانوگرم در میلی‌لیتر و همچنین غلظت 0/49 نانوگرم در میلی‌لیتر سم استخراجی از جدایه آلوده گردید و سپس مخمرها اضافه و انکوباسیون شدند. سپس در زمان‌های صفر و 120 دقیقه سانتریفوژ شده و سوپرناتانت به‌دست آمده برای تعیین غلظت توکسین باقی‌مانده توسط روش الایزای رقابتی مستقیم بررسی گردید. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با آزمایش فاکتوریل انجام شد. فاکتور اول گونه مخمر(چهار سطح: سه مخمر و تیمار بدون مخمر)، فاکتور دوم غلظت (چهار سطح: صفر، 0/25، 0/50 و 0/49 نانوگرم بر میلی‌لیتر) و فاکتور سوم زمان (شامل دو سطح: صفر و 120 برای معده) بود. این آزمایش در سه تکرار انجام شد. نتایج نشان داد هر سه مخمر نسبت به شاهد (بدون مخمر) در کاهش غلظت توکسین در معده توانایی داشتند اما تأثیر رودوترولا موسیلاژینوزا بیشتر از سایرین بود. کمترین غلظت سم در سوپرناتانت در غلظت 25 ng/ml/ نانوگرم در میلی‌لیتر مشاهده شد. همچنین با گذشت زمان غلظت توکسین در سوپرناتانت کاهش یافت. اثر متقابل گونه مخمر و غلظت توکسین نشان داد نسبت به شاهد در هر سه غلظت هر سه مخمر توانایی کاهش غلظت توکسین را داشتند. حداقل غلظت توکسین در سوپرناتانت معده در غلظت 0/25 ng/mlو گونه *رودوترولا موسیلاژینوزا* به‌دست آمد. نتایج اثر متقابل گونه مخمر و زمان نشان داد در هر دو زمان، هر سه مخمر توانایی کاهش غلظت توکسین در سوپرناتانت را داشتند و حداقل غلظت توکسین در سوپرناتانت در زمان 120 دقیقه و برای گونه *رودوترولا موسیلاژینوزا* مشاهده شد. نتایج اثر متقابل زمان و غلظت نشان داد در غلظت 0/25 ng/ml غلظت توکسین در سوپرناتانت در 120 دقیقه در کمترین حد خود بود. نتایج اثر متقابل گونه مخمر، زمان و غلظت توکسین مشخص کرد کمترین غلظت توکسین در سوپرناتانت مربوط به تیمار مخمر *رودوترولا موسیلاژینوزا* در زمان 120 دقیقه و غلظت 0/25 ng/ml بود. در مجموع، نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر نشان داد هر سه گونه مخمر توانایی کاهش آفلاتوکسین B1 را در محیط معده داشتند اما مخمر *رودوترولا موسیلاژینوزا* را می‌توان به‌عنوان موثرترین (کارآمدترین) جدایه در بیوکنترل آفلاتوکسین B1 معرفی نمود.

واژه‌های کلیدی: *آسپرژیلوس فلاووس*، آفلاتوکسین B1، مخمر، محیط شبیه‌سازی شده معده

مقدمه

گونه‌های جنس آسپرژیلوس[3] طیف گسترده‌ای از متابولیت‌های ثانویه تولید می‌کنند. بعضی از این ترکیبات خواص بیولوژیکی مفیدی دارند، از قبیل آنتی‌بیوتیک یا آنتی‌کلسترمیک، در حالی که بقیه زیان‌آور هستند، مانند مایکوتوکسین‌ها که ممکن است سمی، موتاژنیک یا کارسینوژنیک باشند (Zhuang *et al*., 2016). *آسپرژیلوس فلاووس* یک قارچ ساپروفیت و رشته‌ای است که اغلب دانه‌های خوراکی و دانه‌های روغنی محصولات مختلف را با تولید مایکوتوکسین‌هایی از قبیل سیکلوپیازونیک اسید، آفلاترم[4] و معروفترین آن‌ها آفلاتوکسین، آلوده می‌کند (Wang *et al*., 2016).

1- دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه میکروبیولوژی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.
2- استادیار، گروه بیماری‌شناسی‌گیاهی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران.
(* - نویسنده مسئول: Email: mohammadi.pp@gmail.com)
DOI: 10.22067/ifstrj.v15i4.74793

3 Aspergillus
4 Aflaterm

آفلاتوکسین‌ها از خطرناک‌ترین مایکوتوکسین‌ها می‌باشند که ممکن است در خوراک دام و مواد غذایی یافت شده و توسط گونه‌های جنس *آسپرژیلوس*، نظیر *آسپرژیلوس فلاووس*[1]، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس*[2] و *آسپرژیلوس نومیوس*[3] تولید می‌شوند (کته‌شمشیری و همکاران، 1393). بیش از 20 نمونه از آفلاتوکسین‌ها شناخته شده است، و معروف ترین و مهمترین آن‌ها آفلاتوکسین B1، B2، G1 و G2 هستند. AFB1 سمی‌ترین آن‌هاست، و با سرطان کبد و اختلال در عملکرد سیستم ایمنی بدن در ارتباط است. بنابراین، کاهش غلظت آفلاتوکسین در مواد غذایی ضروری است (Zhou *et al*., 2017). روش‌های فیزیکی مانند گرما، اشعه فرابنفش و تابش یونیزه کننده می‌باشد که اثر این روش‌ها به عوامل زیاد مانند تعداد و نوع گونه قارچی، دوز اشعه، ترکیب مواد غذایی و رطوبت هوا بستگی دارد (Jalili *et al*., 2012; Udomkun *et al*., 2017) روش‌های شیمیایی با افزودن مواد کلرینه کننده، اکسیدکننده، هیدرولیتیک صورت می‌گیرد که نیازمند تجهیزات گران بوده و ممکن است کیفیت محصول را کاهش داده و اثرات نامطلوبی بر سلامتی ایجاد کنند. همچنین محدودیت‌هایی مانند زمان طولانی تخریب (بیش از 72 ساعت)، تخریب ناقص از دیگر معایب روش‌های فیزیکی و شیمیایی است. بیشتر محققین معتقدند که بهترین روش سم‌زدایی مواد غذایی آلوده به مایکوتوکسین، استفاده از گونه‌های موثر میکروبی است که دارای خصوصیت کاهش آفلاتوکسین تحت شرایط ملایم، بدون استفاده از مواد شیمیایی مضر و از دست دادن ارزش تغذیه‌ای فراهم می‌سازد (رهایی و همکاران، 1389). در این راستا، تحقیقاتی در ارتباط با تأثیر باکتری‌های خانواده اسید لاکتیک، گونه‌های پروبیوتیک، قارچ‌های مؤثر (تریکودرما) و مخمرها (مانند *ساکارومایسس سرویزیه و رایزوپوس اولیگوسپوروس*) بر کاهش جذب افلاتوکسین انجام شده است. صاحب قلم و همکاران (1392)، در تحقیقی توانایی اتصال آفلاتوکسین به دیواره سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه*[4] جهت کاهش سمیت در خوراک دام را مورد بررسی قرار دادند. به این منظور آفلاتوکسین B1 در غلظت‌های صفر، 5، 10 و 20 میکروگرم بر لیتر به پنبه دانه به‌عنوان خوراک دام اضافه شد و سپس توسط مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در فاز لگاریتمی رشد، و همچنین مخمر تیمار شده با اسید و حرارت به مدت زمان‌های صفر، 4، 12 و 24 ساعت تلقیح گردید. در میانگین غلظت‌های مختلف سم بیشترین میزان کاهش توکسین مربوط به تیمار اسیدی (3/417 نانوگرم بر میلی‌لیتر) بوده و سپس تیمار حرارتی (3/607 نانوگرم بر میلی‌لیتر) و مخمر زنده (3/96 نانوگرم بر میلی‌لیتر) بیشترین کارایی را از خود نشان دادند.

1 *Aspergillus flavus*
2 *Aspergillus parasiticus*
3 *Aspergillus nomius*
4 *Saccharomyces cerevisiae*

همچنین بیشترین میزان کاهش آفلاتوکسین بعد از چهار ساعت مشاهده شد که نشانگر سرعت عمل و اشباع شدن محل‌های اتصال بعد از این زمان بود. نتایج نشانگر این بود که سلول‌های مخمر زنده یا غیر زنده عوامل بیولوژیکی مناسبی جهت حذف آفلاتوکسین در محیط کشت آلوده هستند. کته‌شمشیری و همکاران (1393)، در تحقیقی توانایی *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس*[5] در حذف آفلاتوکسین M1 را در مدل شبیه‌سازی شده معده بررسی کردند. بدین منظور از باکتری در دو سطح 3×10^9 cfu/ml و 3×10^{10} جهت تعیین توانایی آن در کاهش سم استفاده شد. آفلاتوکسین M1 در غلظت‌های 0/05 ppb، 0/25 و 0/5 به‌کار رفت. زمان اینکوباسیون در مدل شبیه‌سازی شده معده، صفر، 30، 60، 90 و 120 دقیقه بود. غلظت آفلاتوکسین توسط روش الایزای رقابتی تعیین شد. نتایج نشان داد حضور باکتری در سطح بالاتر (3×10^{10} cfu/ml) تاثیر بیشتری در کاهش سم داشت. همچنین درصد حذف برای غلظت‌های 0/05 ppb، 0/25و 0/5 به‌ترتیب 76/09، 52/26 و 76/19 به‌دست آمد. نتایج گویای آن است که در میان غلظت‌های مختلف زمان 60 دقیقه بیشترین تاثیر را در کاهش سم داشت، به‌طوری که مقدار آفلاتوکسین باقی مانده پس از گذشت 60 دقیقه 0/08304 نانوگرم بر میلی لیتر به‌دست آمد. این در حالی است که در 120 دقیقه اینکوباسیون کمترین کاهش سم مشاهده گردید؛ به‌گونه‌ای که مقدار آفلاتوکسین باقی مانده 0/08368 نانوگرم بر میلی‌لیتر بود. اصغرنژاد و همکاران (1393)، در تحقیقی به ارزیابی تولید آفلاتوکسین‌های B1، B2، G1 و G2 در چند گونه قارچ *آسپرژیلوس* در محیط کشت سیب زمینی دکستروز براث[6] و به روش HPLC پرداختند. نتایج نشان داد در در گونه *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* میزان تولید آفلاتوکسین B1 بیشترین و آفلاتوکسین G1 کمترین مقدار در بین چهار نوع آفلاتوکسین مورد آزمایش بود. بامیار و همکاران (1394)، در تحقیقی تاثیر انواع مخمر بر میزان آفلاتوکسین B1 طی فرایند تهیه نان را مورد پژوهش قرار دادند. برای این منظور ابتدا سم خشک آفلاتوکسین به آرد اضافه شد و سپس نان تهیه گردید. برای تهیه خمیر از سه نوع مخمر موجود در بازار (مخمر خشک فعال، مخمر خشک فوری و مخمرفشرده) استفاده شد. میزان سم آفلاتوکسین موجود در خمیر،در دو مرحله پروف اولیه و پروف نهایی اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد بیشترین میزان کاهش آفلاتوکسین مربوط به پروف اولیه بود. همچنین مخمر خشک فوری بیشترین تاثیر را داشته، این درحالی است که مخمر فشرده کمترین میزان کاهش سم را نشان داد. Mahesh و Devegowda (1996)، در طی مطالعه‌ای در شرایط آزمایشگاهی مشاهده کردند که افزودن 0/05% مانوالیگوساکارید

5 *Lactobacillus acidophilus*
6 Potato dextrose broth

(استخراج شده از دیواره سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه)* به خوراک آلوده با 200 میکروگرم بر کیلوگرم آفلاتوکسین، 79% سم موجود را به خود متصل کرد. El-Nezami و همکاران (2000)، نشان دادند کاهش آفلاتوکسین B1 در حضور *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* زیرگونه‌ی GG در بافت روده در مدت 60 دقیقه، 74 درصد بود. آن‌ها همچنین (1998) عنوان نمودند کشت 24 ساعت *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* زیرگونه GG و *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* زیر گونه LC-705 قادر به جذب 80 درصد آفلاتوکسین B1 می‌باشد. همچنین مطالعات آن‌ها نشان داد مقدار آفلاتوکسین B1 حذف شده با افزایش غلظت سم، افزایش پیدا کرد اما درصد حذف از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری نداشت. بر اساس مطالعات Shetty و همکاران (2006)، پدیده اتصال آفلاتوکسین یک پدیده فیزیکی بوده که در سطح مخمر یعنی در دیواره سلولی آن اتفاق می‌افتد. آن‌ها مشاهده کردند که 75% قدرت اتصال مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* مربوط به مواد استخراج شده از دیواره سلولی بوده و زمانی که الیگوساکارید مانان تغییر یافته از دیواره مخمر مشتق می‌شود این مقدار به 95% می‌رسد. آن‌ها اظهار کردند که مطالعات اخیر بیانگر این است که قسمت پلی ساکاریدی دیواره سلولی در اتصال سطحی آفلاتوکسین در گونه مخمر موثر واقع می‌شود. Moreira da silva و همکاران (2015)، در تحقیقی از پروبیوتیک‌ها جهت کنترل تولید آفلاتوکسین در دانه‌های بادام استفاده کردند. در این تحقیق از میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک شامل *ساکارومایسس سرویزیه* واریته *بولاردی*[1] ، *ساکارومایسس سرویزیه* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی*[2] به تنهایی و یا در ترکیب با هم استفاده شد. همه میکروارگانیسم‌های پروبیوتیک در شکل زنده و غیرفعال به‌طور چشم گیری اسپورزایی *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* را کاهش دادند، ولی بهترین نتیجه از سلول‌های زنده به‌دست آمد. تیمارهایی که به تنهایی تلقیح شدند کاهش در تولید آفلاتوکسین به‌ترتیب 72/8% و 65/8% برای *ساکارومایسس بولاردی* و *ساکارومایسس سرویزیه* بود. هنگامی که میکروارگانسیم‌های فوق در ترکیب دوتایی با هم تلقیح شدند، بهترین نتیجه در کاهش آفلاتوکسین از ترکیب *ساکارومایسس بولاردی* و *لاکتوباسیلوس دلبروکی* به دست آمد. Magnoli و همکاران (2017)، در تحقیقی استفاده از مخمر *پیچیا کودری آوزویی*[3] را به‌عنوان یک افزودنی غذایی جدید برای بهبود اثرات آفلاتوکسین B1 بر روی عملکرد جوجه مرغ‌ها بررسی کردند. هدف از این مطالعه بررسی اثر بخشی این مخمر به عنوان یک جاذب زیستی جدید برای آفلاتوکسین B1 بود. انتخاب این مخمر بر اساس ظرفیت جذب آفلاتوکسین B1 که قبلا در شرایط آزمایشگاهی ثابت شده، بود. این آزمایش نشان داد که تلقیح این مخمر بومی (0/1%) به جیره غذایی حاوی آفلاتوکسین B1 جوجه‌ها، در بهبود اثرات نامطلوب آفلاتوکسین B1 بر تولید، موثر نشان داده شد. در همین راستا تحقیق حاضر به هدف تعیین تأثیر مخمرهای *پیچیا فرمنتانس*[4]، *رودوتورولا موسیلاژینوزا*[5] و *ساکارومایسس سرویزیه*[6] بر کاهش آفلاتوکسین B1 قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* در مدل شبیه‌سازی شده معده مورد بررسی قرار گرفت.

1 *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*
2 *Lactobacillus delbrueckii*
3 *Pichia kudriavzevii*

مواد و روش‌ها

این پژوهش از فروردین الی مهرماه 1396 صورت گرفت. نمونه گیری از ذرت‌های مشکوک به *آسپرژیلوس فلاوس* به‌صورت تصادفی از چند سیلوی در سه شهرستان شیراز، مرودشت و آباده در دو نوبت نمونه گیری گردید.

جداسازی، خالص سازی و شناسایی

برای این منظور از روش Thathana و همکاران (2017) استفاده شد. نمونه‌های ذرت به‌منظور جداسازی قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* بر روی محیط سابورو دکستروز آگار[7] کشت داده شدند. سپس قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* رشد یافته در اطراف دانه‌های ذرت، توسط سوزن کشت استریل بر روی محیط کشت‌های دکستروز آگار سیب زمینی کشت داده شدند. به منظور خالص سازی جدایه‌ها از روش نوک ریسه‌گیری[8] بر روی محیط آب-آگار استفاده شد (Selma *et al*., 2008). به‌منظور شناسایی قارچ از روش اسلاید کالچر استفاده شد و ساختارهای هیف، کنیدیوفور، متولا، فیالید و کنیدیوم بررسی شد (Hibbett *et al*., 2007).

تولید آفلاتوکسین B1 در جدایه ها

به‌منظور تولید آفلاتوکسین با استفاده از تیغ استریل، قطعه‌ای از قارچ‌های رشدیافته بر روی محیط سیب زمینی دکستروز آگار[9] به ابعاد 5 میلی‌متر در پنج میلی‌متر و قطر تقریبی 5 میلی‌متر در 100 میلی‌لیتر محیط کشت مایع سیب زمینی دکستروز براث (PDB 100 ml) کشت داده شدند. محیط‌های مایه‌زنی شده در محیط تاریک و دمای اتاق (25 درجه سلسیوس) به‌صورت ساکن نگهداری شدند. پس از گذشت 22 روز از کشت، به‌منظور آزمایش تولید یا عدم تولید آفلاتوکسین، استخراج آفلاتوکسین به روش حلالیت در کلروفرم انجام شد (اصغرنژاد و همکاران، 1393).

4 *pichia fermantans*
5 *Rhodotorulamucilaginosa*
6 *Saccharomyces cerevisiae*
5 Sabouraud 4% dextrose agar (SDA)
6 Hyphal tip
7 Potato Dextrose Agar (PDA)

آزمایش با اشعه UV

نمونه استخراج شده از محیط کشت مایع سیب‌زمینی دکستروز که قارچ در آن رشد کرده بود، جهت ارزیابی اولیه زیر نور UV، با طول موج 365 نانومتر قرار داده شد. نمونه از نظر تابش فلوئورسنت آبی آزمایش شد. وجود آفلاتوکسین B1 در نمونه با تابش فلورسانس آبی مشخص شد (تاتانا و همکاران، 2017).

استخراج آفلاتوکسین B1 از جدایه‌ها

به‌منظور استخراج آفلاتوکسین B1، محیط کشت مایع 22 روزه از کاغذ صافی واتمن عبور داده شد و سپس 10 میلی‌لیتر کلروفرم به 25 میلی‌لیتر از مایع صاف شده محیط کشت اضافه شد و درون قیف دکانتور ریخته شد (فردوس و همکاران، 2009). پس از مخلوط شدن به مدت 20 دقیقه قیف دکانتور به‌طور منظم به‌هم زده شد. بعد از گذشت مدت زمان 20 دقیقه فاز زیرین که حاوی آفلاتوکسین بود جدا شد. فاز رویی دور ریخته شد. به‌منظور تبخیر حلال، در دمای 45 درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از تبخیر حلال، رسوب حاصله در 3 میلی‌لیتر متانول حل و از فیلتر سر سرنگی 0/22 میکرومتری عبور داده شد(عباس و همکاران، 2006). محلول حاصل به دستگاه HPLC (Agilent) سری 1200 با دتکتور فلورسانس تزریق شد پس از آنالیز نمونه توسط دستگاه HPLC، وجود آفلاتوکسین B1 در نمونه تایید گردید. به‌منظور شناسایی توکسین‌های قارچی، بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره 6872 از طریق کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا انجام شد. نمونه‌های استخراج شده از قارچ *آسپرژیلوس فلاووس* به دستگاه HPLC با ستون(ZORBAX Eclipse-XDB, C18، آجیلنت، آمریکا) تزریق شد. شرایط کار با دستگاه HPLC به شرح زیر بود:

فاز متحرک: آب- استونیتریل (25:75 v/v)

فاز ساکن: ستون C18 (150 mm×4.6 mm, 5 µm)

آشکارساز فلورسانس: طول موج برانگیختگی 365 nm و طول موج نشر 435 nm

سرعت جریان 0/8 mL/min و در این شرایط زمان بازداری 7-8 دقیقه مشاهده گردید.

آماده‌سازی کشت مخمرها

مخمرهای *پیچیا فرمنتانس*[1] (PTCC 5296)، *رودوتورولا موسیلاژینوزا* سوش *موسیلاژینوزا*[2] (PTCC 5257) و *ساکارومایسس سرویزیه*[3] (PTCC 5269) از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران کلکسیون باکتری‌ها و قارچ‌ها تهیه گردید. هر سه گونه مخمر در محیط کشت Yeast Mold Broth در دمای 25 درجه سلسیوس به مدت یک هفته گرمخانه‌گذاری گردیدند (رهایی و همکاران،2010). پس از یک هفته، به‌منظور شمارش مخمرها از روش تهیه رقت استفاده گردید. شمارش مخمرها به روش شمارش بر روی محیط کشت انجام گردید. از روش شمارش و تکثیر با جذب نوری به دلیل اینکه مخمرهای مرده نیز محاسبه می‌شود استفاده نگردید. در روش شمارش بر روی محیط کشت پس از کشت مخمرها درون محیط کشت پلیت کانت آگار پس از مدت زمان‌های 24، 48 و 72 با تهیه رقت از محیط مخمرها به روش استاندارد پلیت کانت ارزیابی شد. بدین منظور 10 عدد لوله‌ی آزمایش حاوی 9 میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی استریل گردید. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون مخمر به لوله شماره یک منتقل گردید. سپس یک میلی‌لیتر از لوله شماره یک به لوله بعدی منتقل گردید و تا به‌دست آمدن رقت $2×10^{10}$ تکرار شد. سپس از هر لوله 0/1 میلی‌لیتر به محیط کشت جامد پلیت کانت آگار منتقل گردید. پس از رشد، کلنی‌ها شمارش گردیدند و غلظت CFU/ml $2×10^{10}$ تعیین گردید (Lehmann *et al.*, 1991).

آماده‌سازی محیط شبیه‌سازی شده معده

به‌منظور آماده‌سازی محیط شبیه‌سازی شده معده، ابتدا محلول اسید کلریدریک 0/08 مولار تهیه گردید. پس از آن محلول کلرید سدیم با غلظت 0/2 درصد تهیه گردید. دو محلول تهیه شده با یکدیگر ترکیب شدند و در مرحله آخر pH محیط با سود نرمال و اسید نرمال و با استفاده از دستگاه pHمتر حدود 1/5 تنظیم گردید (کته شمشیری و همکاران، 1393). محلول حاصل توسط ست فیلتراسیون با مکش پمپ خلاء با فیلتر 0/22 میکرومتری استریل گردید.

آلوده‌سازی محیط معده به آفلاتوکسین B1

محلول آفلاتوکسین B1 با غلظت 100 نانوگرم در میلی‌لیتر از شرکت کیمیاگران شیمی صنعت خریداری گردید. از محلول استوک اصلی محلول های استوک ثانویه آفلاتوکسین B1 در غلظت‌های صفر (شاهد)، 0/25 و 0/5 نانوگرم در میلی‌لیتر تهیه گردیدند. سپس 0/1 میلی‌لیتر از آفلاتوکسین B1 با غلظت‌های 0/25 و 0/5 نانوگرم در میلی لیتر (Masoero *et al.*, 2009) و همچنین غلظت 0/49 نانوگرم در میلی‌لیتر آفلاتوکسین استخراجی از گونه *آسپرژیلوس فلاووس* به محیط شبیه‌سازی شده معده اضافه گردید. سپس در انکوباسیون در دمای 37 درجه سلسیوس نگهداری شد.

4- *Pichia fermentans*

5- *Rhodotorula mucilaginosa* var. *mucilaginosa*

6- *Saccharomyces cerevisiae*

افزودن مخمرها به محیط شبیه‌سازی شده معده آلوده به آفلاتوکسین

یک سی‌سی از سوسپانسیون سه مخمر به‌طور کامل در 9 سی‌سی شیره شبیه‌سازی شده معده آلوده به آفلاتوکسین B1 (با غلظت‌های صفر، 0/25، 0/5 و 0/49 نانوگرم در میلی‌لیتر و حداکثر غلظت استخراجی جدایه) اضافه گردید. در تیمارهای بدون مخمر یک سی‌سی آب مقطر استریل به محیط شبیه‌سازی شده معده اضافه گردید. اینکوباسیون در دمای 37 درجه سلسیوس به مدت زمان‌های صفر و 120 دقیقه برای معده انجام گردید. پس از نمونه‌برداری در زمان‌های صفر و 120 دقیقه برای معده، نمونه‌ها در 7500 rpm به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شدند. در نهایت سوپرناتانت جداسازی و در دمای 4 درجه سلسیوس نگهداری گردید (کته‌شمشیری و همکاران، 1393).

اندازه‌گیری میزان افلاتوکسین B1 باقی‌مانده در سوپرناتانت با استفاده از الایزا

میزان آفلاتوکسین B1 باقی‌مانده در نمونه‌های سوپرناتانت با استفاده از روش الایزا محاسبه شد. مراحل کلی آزمون الایزا طبق دستورالعمل کیت الایزای خریداری شده از شرکت ایست‌بیوفارم با مشخصه CK-E91237 انجام شد. طبق دستورالعمل این کیت روش به‌کار رفته بر پایه الایزای رقابتی مستقیم است. این روش یک ایمونواسی آنزیم رقابتی و بر پایه واکنش آنتی‌ژن آنتی بادی است. طبق دستورالعمل، چاهک‌ها با آنتی بادی بر علیه آفلاتوکسین B1 استاندارد یا نمونه‌های مورد بررسی، پوشانده شدند. با اضافه کردن آفلاتوکسین B1 استاندارد (کنترل) یا نمونه، آنتی بادی‌ها به‌طور نسبی بر اساس غلظت آفلاتوکسین موجود به آن متصل شدند.

آنتی بادی‌های آزاد در مرحله بعد به‌وسیله توکسین نشان‌دار شده با آنزیم کونژوگه متصل شدند. سپس سوبسترای آنزیم کروموژن به چاهک‌ها اضافه گردید. واکنش پس از طی دوره اینکوباسیون و پس از تغییر رنگ از آبی به زرد در دستگاه الایزا ریدر در طول موج 450 nm، با اضافه کردن ترکیب متوقف کننده خاتمه یافت. پس از رسم منحنی استاندارد آفلاتوکسین B1، نتایج حاصل از اندازه‌گیری باقیمانده سم در نمونه‌های مورد بررسی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. میزان جذب نسبت معکوسی با غلظت آفلاتوکسین در نمونه دارد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این آزمایش‌ها به‌صورت طرح پایه کاملا تصادفی در قالب فاکتوریل با سه فاکتور در مدل شبیه‌سازی شده معده به شرح ذیل با سه تکرار انجام گردید:

فاکتور A گونه مخمر در چهار سطح شامل: 1- بدون مخمر(شاهد)، 2- *پیچیا فرمنتانس*، 3- *رودوترولا موسیلاژینوزا*، 4- *ساکارومایسس سرویزیه*.

فاکتور B شامل غلظت آفلاتوکسین B1 در چهار سطح: 1- صفر (شاهد)، 2- 0/25 نانوگرم در میلی لیتر استاندارد، 3- 0/5 نانوگرم در میلی‌لیتر استاندارد، 4- 0/49 نانوگرم در میلی‌لیتر (سم استخراجی).

فاکتور C شامل زمان اثر مخمرها در دو سطح:1- زمان صفر، 2- زمان 120 دقیقه.

در نهایت داده‌ها با نرم‌افزار آماری SAS ver 9.0 تجزیه و تحلیل شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون چنددامنه‌ای دانکن و رسم نمودارها با استفاده از برنامه اکسل انجام شد.

نتایج و بحث

آفلاتوکسین‌ها از خطرناک‌ترین مایکوتوکسین‌های موجود در مواد غذایی میباشند که توسط گونه‌های جنس آسپرژیلوس تولید می‌شوند (کته‌شمشیری و همکاران، 1393). آفلاتوکسین B1 سمی‌ترین آن‌هاست بنابراین، کاهش غلظت آن در مواد غذایی ضروری است (ژو و همکاران، 2017). اخیرا استفاده از میکروارگانیسم‌ها جهت کاهش جذب مایکوتوکسین‌ها در دستگاه گوارش افزایش یافته است. دیواره سلولی مخمرها حاوی پلی‌ساکاریدهایی نظیر گلوکان و مانان بوده که مکانیسم‌های مختلف (پیوند یونی، هیدروژنی و هیدروفوبی) پیوند با توکسین را فراهم می‌کند (رهایی و همکاران، 1389؛ کته‌شمشیری و همکاران، 1393).

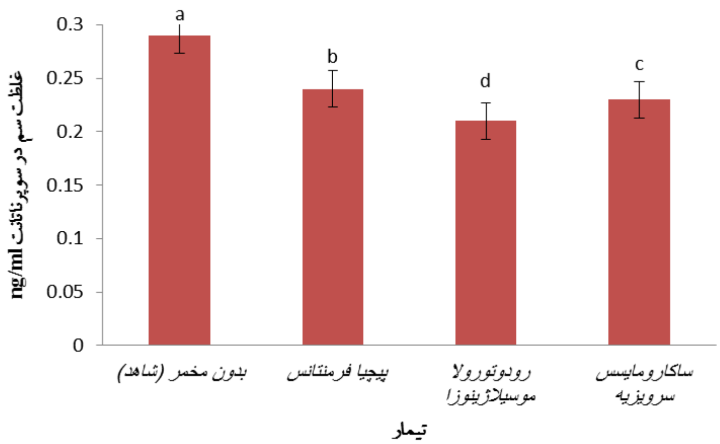
تعیین میزان توکسین استخراجی از قارچ

خاصیت توکسین‌زایی قارچ تحت اشعه فرابنفش و ایجاد فلورسانس آبی مشخص شد. همچنین با تزریق نمونه استخراج شده از قارچ به دستگاه HPLC نیز وجود آفلاتوکسین B1 در نمونه تایید و غلظت آن 49 نانوگرم در میلی‌لیتر مشخص شد.

تأثیر سه گونه مخمر بر کاهش جذب آفلاتوکسین B1 در مدل شبیه‌سازی شده معده

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از تأثیر مخمرهای مختلف بر کاهش غلظت توکسین نشان داد اختلاف بین تیمارهای اثر مستقل گونه مخمر، زمان و غلظت و کلیه اثرات متقابل دوگانه و سه گانه آن‌ها در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر مستقل گونه مخمر مشخص شد هر سه مخمر نسبت به شاهد (بدون استفاده از مخمر) در کاهش غلظت افلاتوکسین توانایی داشتند. از بین این سه گونه تأثیر *رودوتورولا موسیلاژینوزا* در کاهش غلظت افلاتوکسین بیشتر از سایرین بود (شکل 1).

دلیل اینکه هر سه مخمر استفاده شده نسبت به شاهد (بدون استفاده از مخمر) در کاهش غلظت افلاتوکسین B1 توانایی داشتند، توانایی اتصال دیواره سلولی مخمر به افلاتوکسین بوده است. Mahesh و Devegowda (1996)، در طی مطالعه‌ای در شرایط *in vitro* مشاهده کردند که افزودن 0/05% مانوالیگوساکارید (استخراج شده از دیواره سلولی مخمر *ساکارومایسس سرویزیه*) به خوراک آلوده با 200 میکروگرم بر کیلوگرم آفلاتوکسین، 79% سم موجود را به‌خود متصل کرد.



شکل 1- مقایسه میانگین اثر مستقل گونه مخمر بر کاهش غلظت آفلاتوکسین در مدل شبیه‌سازی شده معده بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن

بر اساس بررسی‌ها دیواره سلولی شبکه‌ای از بتا 1و 3 گلوکان با زنجیره‌های جانبی بتا 1 و 6 گلوکان است که مانو پروتئین‌ها به‌وسیله پیوند کووالانسی به لایه داخلی گلوکان متصل شده‌اند و دارای مقدار اندکی کیتین می‌باشند. بر اساس مطالعات شتی و همکاران (2006)، پدیده اتصال آفلاتوکسین یک پدیده فیزیکی بوده که در سطح مخمر یعنی در قسمت پلی‌ساکاریدی دیواره سلولی آن اتفاق می‌افتد. آن‌ها مشاهده کردند که 75% قدرت اتصال مخمر مربوط به مواد استخراج شده از دیواره سلولی بوده و زمانی که الیگوساکارید-مانان تغییر یافته از دیواره مخمر مشتق می‌شود این مقدار به 95% می‌رسد. طبق نتایج تحقیق ژو و همکاران (2017) نیز، مشاهده شد که اتصال، عمده‌ترین دلیل حذف آفلاتوکسین B1 توسط *زیگوساکارومایسس روکسی* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* در تخمیر مایع بود. میزان آفلاتوکسین باند شده توسط این دو میکروارگانیسم بیشتر از 50 درصد بود. این بررسی نشان داد که بجای تجزیه در تخمیر مایع، سلول‌های این دو مخمر فقط توانستند آفلاتوکسین را به‌وسیله اتصال حذف نمایند. بر اساس پژوهشی از مگنولی و همکاران (2017)، مشخص شد که استفاده از مخمر *Pichia kudriavzevii* به‌عنوان یک افزودنی غذایی و یک جاذب زیستی جدید برای کاهش اثرات آفلاتوکسین B1 بر روی عملکرد جوجه مرغ‌ها موثر است.

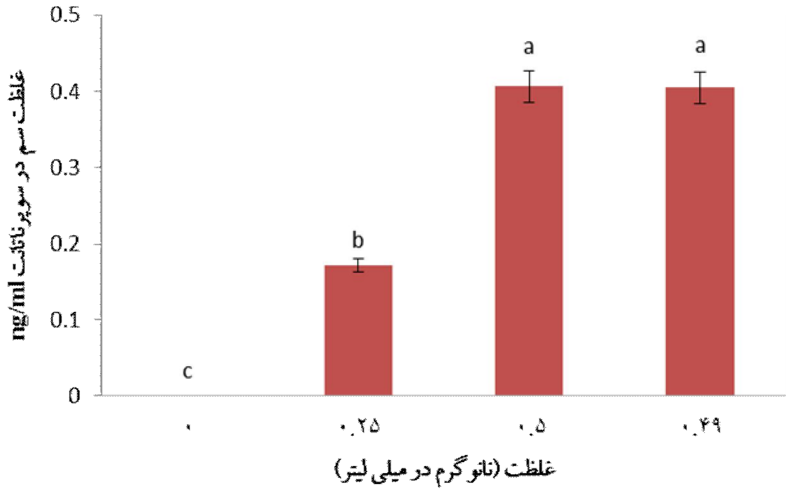
نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر مستقل غلظت (شکل 2) مشخص کرد نسبت به شاهد (عدم کاربرد توکسین) بیشترین غلظت توکسین در سوپرناتانت در تیمارهای غلظت 0/49 و 0/5 نانوگرم در میلی لیتر بود که تفاوت آماری با یکدیگر نداشتند و همانگونه که انتظار می رفت کمترین غلظت سم در سوپرناتانت در غلظت 0/25 نانوگرم در میلی‌لیتر مشاهده شد.

در پژوهش حاضر مشخص شد که در غلظت 0/25 نانوگرم بر میلی لیتر مقدار حذف آفلاتوکسین B1 کمتر از دو غلظت دیگر بود اما در غلظت‌های 0/49 و 0/5 نانوگرم در میلی‌لیتر مقدار حذف آفلاتوکسین افزایش یافت که با نتایج ال-نظامی و همکاران (1998) که نشان دادند مقدار آفلاتوکسین B1 حذف شده با افزایش غلظت سم، افزایش درصد اتصال نسبتا مشابهی حاصل می‌گردد، مطابقت داشت.

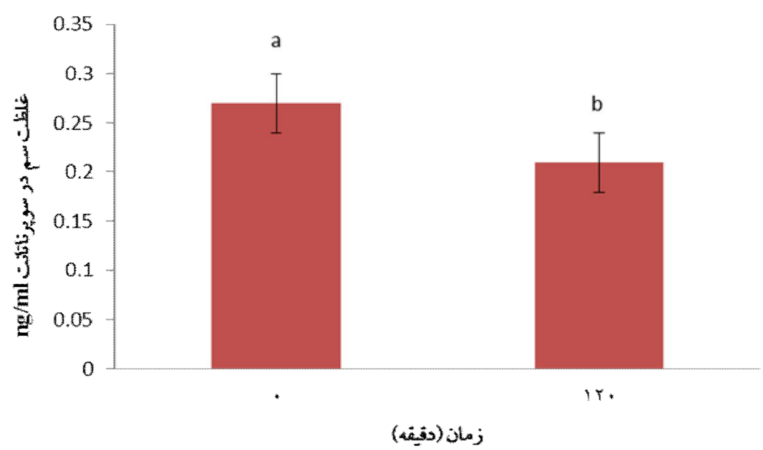
نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر مستقل زمان (شکل 3) مشخص کرد با گذشت زمان غلظت توکسین در سوپرناتانت کاهش یافت. غلظت توکسین در 120 دقیقه کمتر از زمان صفر بود. در همین راستا کته‌شمشیری و همکاران (1393) با بررسی توانایی *Lactobacillus acidophilus* در حذف آفلاتوکسین M1 را در مدل شبیه‌سازی شده معده گزارش کردند به‌نظر می‌رسد که علت این کاهش می‌تواند باز شدن اتصال میان توکسین و دیواره سلولی باکتری در طول زمان باشد

El-khoury و همکاران (2011) مشخص نمودند توانایی اتصال *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* به آفلاتوکسین M1 از دو ساعت تا 14

ساعت، تا 70 درصد افزایش یافت. این در حالی است که در پژوهش حاضر نیز بعد از 120 دقیقه در محیط معده غلظت آفلاتوکسین B1 کاهش یافت و مخمرها قادر بودند غلظت توکسین را به مقدار بیشتری کاهش دهند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل گونه مخمر و غلظت توکسین (جدول 2) نشان داد نسبت به شاهد در هر سه غلظت هر سه مخمر توانایی کاهش غلظت توکسین را داشتند. حداقل غلظت توکسین در سوپرناتانت در غلظت 0/25 نانوگرم در میلی لیتر و گونه *رودوتورولا موسیلاژینوزا* و پس از آن تیمارهای دو گونه مخمر دیگر در همین غلظت مشاهده شد. در دو غلظت 0/49 و 0/5 نیز *رودوتورولا موسیلاژینوزا* توانایی بیشتری در کاهش غلظت توکسین در سوپرناتانت را داشت.



شکل 2- مقایسه میانگین اثر مستقل غلظت توکسین بر کاهش غلظت افلاتوکسین در مدل شبیه‌سازی شده معده بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن



شکل 3- مقایسه میانگین اثر مستقل زمان بر کاهش غلظت افلاتوکسین در مدل شبیه‌سازی شده معده بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن

در تحقیق حاضر تاثیر سه گونه مخمر بر کاهش میزان آفلاتوکسین B1 بررسی شد که بر اساس نتایج مشخص شد که از میان سه مخمر توانایی *رودوتورولا موسیلاژینوزا* در کاهش غلظت آفلاتوکسین B1 و در غلظت‌های 0/49 و 0/5 نانوگرم بر میلی لیتر بیشتر از سایرین بود. مطابق با نتایج حاصل از این پژوهش، در پژوهش کته شمشیری و همکاران (1393) نیز، مشخص شد که در محیط شبیه سازی شده‌ی معده کمترین میزان باقیمانده آفلاتوکسین در حضور باکتری و غلظت پایین سم (0/05 ppb) مشاهده شد که با

نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. Kabak و همکاران (2009) نیز، تاثیر تعدادی باکتری پروبیوتیک را بر کاهش میزان آفلاتوکسین و اکراتوکسین در دو نمونه غذای کودک مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که در نمونه اول که با 1/76 ppb آفلاتوکسین B1 و 3/2 ppb اکراتوکسین آلوده شده بود، *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بیشترین قابلیت را در کاهش میزان سموم داشت. به‌طوری که در حضور *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* نسبت باقیمانده آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین به‌ترتیب 0/79 و 0/63 بود. در نمونه دوم که حاوی 3/75 ppb آفلاتوکسین B1 و 13/1 ppb اکراتوکسین بود، در حضور *لاکتوباسیلوس کازئی* نسبت باقیمانده آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین به‌ترتیب به 0/72 و 0/83 رسید که این نتایج همچنین نشان می‌دهد که مطابق پژوهش حاضر در غلظت بالاتر آفلاتوکسین درصد حذف آفلاتوکسین افزایش می‌یابد.

جدول 2- مقایسه میانگین اثر متقابل گونه مخمر× غلظت توکسین بر کاهش غلظت افلاتوکسین در مدل شبیه‌سازی شده معده بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد

تیمار	میانگین در غلظت‌های مختلف (نانوگرم بر میلی لیتر)			
	صفر	0/25	0/5	0/49
بدون مخمر(شاهد)	0±0/000 k	0/228±0/013 h	0/473±0/015 a	0/465±0/016 b
پیچیا فرمنتانس	0±0/000 k	0/165±0/060 i	0/405±0/038 c	0/405±0/038 c
رودوتورولا موسیلاژینوزا	0±0/000 k	0/136±0/055 j	0/356±0/088 g	0/380±0/077 e
ساکارومایسس سرویزیه	0±0/000 k	0/160±0/044 i	0/395±0/071 d	0/370±0/055 f

نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل گونه مخمر و زمان (جدول 3) نشان داد نسبت به شاهد غلظت توکسین در سوپرناتانت در بازه زمانی 120 دقیقه برای هر سه مخمر کمتر از زمان صفر بود. همچنین در هر دو زمان، هر سه مخمر توانایی کاهش غلظت توکسین در سوپرناتانت را داشتند. حداقل غلظت توکسین در سوپرناتانت در زمان 120 دقیقه و برای گونه *رودوتورولا موسیلاژینوزا* و سپس *ساکارومایسس سرویزیه* مشاهده شد. در زمان صفر تفاوتی بین این دو گونه مخمر از نظر غلظت توکسین در سوپرناتانت مشاهده نشد.

جدول 3- مقایسه میانگین اثر متقابل گونه مخمر× زمان بر کاهش غلظت افلاتوکسین در مدل شبیه‌سازی شده معده بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد

تیمار	میانگین زمان‌های مختلف (دقیقه)	
	صفر	120
بدون مخمر (شاهد)	0/301±0/209 a	0/281±0/198 b
پیچیا فرمنتانس	0/277±0/193 b	0/210±0/167 d
رودوتورولا موسیلاژینوزا	0/268±0/196 c	0/168±0/135 f
ساکارومایسس سرویزیه	0/270±0/193 c	0/192±0/145 e

در پژوهش حاضر نتایج نشان داد که در محیط شبیه‌سازی شده معده، سلول‌های مخمر تحت تیمار اسیدی به مدت 120 دقیقه قادر به باند کردن آفلاتوکسین B1 به دیواره خود و در نتیجه کاهش غلظت سم می‌باشند. بر اساس تحقیق شتی و همکاران (2007) نیز، در تیمار سلول‌ها با اسید کلریدریک 2 مولار به مدت یک ساعت بیش از دو برابر افزایش در اتصال توکسین مشاهده شد. در مطالعه‌ای دیگر توسط رهایی و همکاران (1389)، بر اساس نتایج مشاهده شد که تیمار گونه‌های مخمر با اسید کلریدریک دو مولار برای 90 دقیقه در دمای اتاق، قدرت اتصال آفلاتوکسین را به حدود 60 درصد می‌رساند. شرایط اسیدی باعث رها شدن مونومرهای پلی‌ساکارید دیواره و شکستن آن‌ها به آلدئیدها می‌شود. شکست اتصالات سبب افزایش اتصال فیزیکی آفلاتوکسین و ساختار دیواره سلولی می‌شود. طبق

بررسی‌ها، احتمال می‌رود که در شرایط اسیدی مقداری از اتصالات درون سلولی باشد. در پژوهشی توسط Elsanhoty (2014)، نتایج، تاثیر pH بر توانایی *بیفیدوباکتریا* در حذف آفلاتوکسین M1 را نشان داد. نتایج نشان داد که شرایط اسیدی نیز در میزان کاهش آفلاتوکسین M1 تاثیر دارد. نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل زمان و غلظت توکسین (جدول 4) نشان داد نسبت به شاهد غلظت توکسین در سوپرناتانت در غلظت 0/25 نانوگرم در میلی‌لیتر در هر دو بازه زمانی کمتر از دو غلظت دیگر بود. در دو غلظت 0/49 و 0/5 تفاوتی در کاهش غلظت توکسین در سوپرناتانت در دو بازه زمانی مشاهده نشد ولی در غلظت 0/25 نانوگرم بر میلی‌لیتر غلظت توکسین در سوپرناتانت در 120 دقیقه کمتر از زمان صفر بود.

جدول 4- مقایسه میانگین اثر متقابل زمان× غلظت توکسین بر کاهش غلظت افلاتوکسین در مدل شبیه‌سازی شده معده بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد

زمان (دقیقه)	میانگین در غلظت‌های مختلف (نانوگرم بر میلی‌لیتر)			
	صفر	0/25	0/5	0/49
صفر	0±0/000 [f]	0/21±0/021 [d]	0/45±0/022 [a]	0/45±0/024 [a]
120	0±0/000 [f]	0/13±0/052 [e]	0/35±0/070 [c]	0/36±0/058 [c]

در پژوهشی توسط صاحب‌قلم و همکاران (1392)، اثر غلظت‌های مختلف آفلاتوکسین بر میزان توکسین باقیمانده در مدت زمان اینکوباسیون انجام شد که نشان داد اینکوباسیون به مدت 4 ساعت باعث کاهش میزان آفلاتوکسین می‌شود که در غلظت 5 ppb میزان آن از 3/923 به 2/12 و در غلظت 10 ppb از 7/821 به 4/17 و در غلظت 20 ppb از 15/27 به 8/231 می‌رسد. به عبارت دیگر سلول‌های مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در غلظت‌های بالاتر سم کاهش بیشتری در غلظت آفلاتوکسین ایجاد کردند چنانچه در غلظت 20 ppb بیشترین کارایی را در اتصال آفلاتوکسین از خود نشان دادند. در پژوهشی توسط کته شمشیری و همکاران (1393)، در اثر متقابل باکتری و زمان اینکوباسیون در کاهش سم مشاهده شد که در حضور باکتری *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* و زمان 30 دقیقه اینکوباسیون درصد حذف آفلاتوکسین افزایش داشته است. در نتایج پژوهش حاضر نیز مشاهده شد که انکوباسیون به مدت 120 دقیقه باعث کاهش غلظت سم شد که این میزان کاهش در غلظت بیشتر سم یعنی 0/49 و 0/5 نانوگرم بر میلی‌لیتر بیشتر از 0/25 نانوگرم در میلی‌لیتر بود.

نتایج حاصل از مقایسه میانگین اثر متقابل گونه مخمر و زمان و غلظت توکسین (جدول 5) مشخص کرد نسبت به شاهد کمترین غلظت توکسین در سوپرناتانت مربوط به تیمار مخمر *رودوتورولا موسیلاژینوزا* در زمان 120 دقیقه و غلظت 0/25 نانوگرم بر میلی‌لیتر بود. در همین بازه زمانی این مخمر در غلظت‌های 0/5 و 0/49 نیز کمترین میزان سم جذب شده را (در این غلظت‌ها) نشان داد.

جدول 5- مقایسه میانگین اثر متقابل گونه مخمر× زمان× غلظت توکسین بر کاهش غلظت افلاتوکسین در مدل شبیه‌سازی شده معده بر اساس آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح یک درصد

گروه	زمان (دقیقه)	میانگین در غلظت‌های مختلف (نانوگرم بر میلی‌لیتر)			
		صفر	0/25	0/5	0/49
بدون مخمر	صفر	0±0/000 [r]	0/240±0/000 [k]	0/487±0/000 [a]	0/480±0/000 [a]
	120	0±0/000 [r]	0/217±0/006 [l]	0/460±0/000 [b]	0/450±0/010 [b]
پیچیا فرمنتانس	صفر	0±0/000 [r]	0/220±0/000 [l]	0/440±0/000 [c]	0/450±0/017 [b]
	120	0±0/000 [r]	0/110±0/000 [p]	0/370±0/000 [e]	0/360±0/000 [f]
رودوتورولا موسیلاژینوزا	صفر	0±0/000 [r]	0/187±0/006 [n]	0/437±0/015 [c]	0/450±0/017 [b]
	120	0±0/000 [r]	0/087±0/006 [q]	0/277±0/006 [j]	0/310±000 [i]0/
ساکارومایسس سرویزیه	صفر	0±0/000 [r]	0/200±0/000 [m]	0/460±0/000 [b]	0/420±0/000 [d]
	120	0±0/000 [r]	0/120±0/010 [o]	0/330±0/010 [g]	0/320±0/000 [h]

مطالعات ال-نظامی و همکاران (1998)، نشان داد که مقدار آفلاتوکسین B1 حذف شده با افزایش غلظت سم و با گذشت زمان افزایش پیدا کرد اما درصد حذف تفاوت عمده‌ای نداشت. همچنین در مطالعه کته‌شمشیری و همکاران (1393)، مشاهده شد که در غلظت

ppb 0/25 آفلاتوکسین، اثر خودایمنی ظاهر شده و باعث کاهش میزان حذف آفلاتوکسین می‌گردد اما با افزایش غلظت آفلاتوکسین تا ppb 0/5، با توجه به محدود بودن مقاومت باکتری درصد حذف توکسین افزایش یافت. به همین دلیل در این پژوهش نیز مشاهده شد که در غلظت 0/25 نانوگرم بر میلی‌لیتر میزان کاهش غلظت سم تفاوت چشمگیری نداشت اما با افزایش غلظت آفلاتوکسین تا 0/49 و 0/5 نانوگرم بر میلی‌لیتر، به دلیل محدود بودن مقاومت مخمر و از بین رفتن اثر خود ایمنی میزان حذف آفلاتوکسین بیشتر شد. در مطالعه‌ای دیگر از شتی و همکاران (2007)، مقادیر مطلق اتصال آفلاتوکسین به طور خطی با افزایش غلظت آفلاتوکسین B1 افزایش یافت. همچنین غلظت ابتدایی آفلاتوکسین به‌طور قابل توجهی ظرفیت اتصال آفلاتوکسین را تحت تاثیر قرار می‌دهد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان داد که در حضور هر سه گونه مخمر نسبت به شاهد میزان حذف آفلاتوکسین B1 در محیط شبیه‌سازی شده معده افزایش یافت. همچنین با گذشت زمان غلظت آفلاتوکسین B1 در محیط معده کاهش یافت. به علاوه، نتایج مشخص کرد که در غلظت 0/25 نانوگرم در میلی‌لیتر و در حضور مخمر *رودوتورولا موسیلاژینوزا* کمترین میزان غلظت آفلاتوکسین در معده مشاهده شد. این نتایج در حالی به‌دست آمد که غلظت‌های ابتدایی آفلاتوکسین B1 میزان اتصال آفلاتوکسین را تحت تاثیر قرار داده و سلول‌های مخمر در غلظت‌های بالاتر آفلاتوکسین B1 کارایی بیشتری از خود در کاهش غلظت آفلاتوکسین نشان می‌دهند، چنانچه در غلظت‌های بالاتر سم یعنی 0/49 و 0/5 نانوگرم در میلی‌لیتر میزان کاهش بیشتری در غلظت آفلاتوکسین B1 در محیط شبیه‌سازی شده معده مشاهده شد. در مجموع، با توجه به نتایج به‌دست آمده در تحقیق حاضر می‌توان نتیجه گرفت که هر سه گونه مخمر توانایی کاهش آفلاتوکسین B1 را در محیط شبیه‌سازی شده معده داشتند اما استفاده از مخمر *رودوتورولا موسیلاژینوزا* را می‌توان به‌عنوان جدایه‌ای کاربردی در بیوکنترل آفلاتوکسین B1 معرفی نمود.

منابع

اصغرنژاد ف. مهدیان ص. امیری بشلی ب. سید جعفر نظری س. 1393. توانایی تولید آفلاتوکسین‌های B1، B2، G1 و G2 در تعدادی از گونه‌های قارچ آسپرژیلوس به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC). فصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی، 2، 4: 70-55.

بامیار ا. محمدزاده میلانی ج. سید جعفری نظری س. 1394. تاثیر انواع مخمر بر میزان آفلاتوکسین B1 طی فرآیند تهیه نان. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، 3: 339-.346

رهایی س. امام جمعه ز. رضوی ه. مظاهری م. 1388. توانایی سویه *لاکتوباسیلوس رامنوسوس* GG جهت کاهش آفلاتوکسین B1 موجود در پسته. مجله الکترونیک فرآوری و نگهداری مواد غذایی، 1(3): 51-64.

رهایی س. رضوی ه. امام جمعه ز. 1389. بررسی توانایی گونه مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* جهت کاهش آفلاتوکسین موجود در پسته. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، 7(1): 81-87.

صاحب قلم ه. محمدی ثانی ع. مهربان م. 1392. حذف بیولوژیکی آفلاتوکسین B1 توسط مخمر *ساکارومایسس سرویزیه* در خوراک دام. مجله نوآوری در علوم و فناوری غذایی، 3: 99-104.

کته شمشیری م. محمدی ثانی ع. سرابی جماب م. رهنما وثوق پ. مهربان سنگ آتش م. 1393. بررسی اثر *لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس* بر کاهش آفلاتوکسین M1 در مدل شبیه سازی شده معده انسان. پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، 3: 210-204.

Abbas KH. Cartwright DR. Xie W. Shier WT. 2006. Aflatoxins and fumonisin contamination of corn (maize, *Zea mays*) hybrids in Arkansas. *Crop Protection*, 25: 1-9.

Cooney DO. 1980. Activated Charcoal: Antidotal and other medical uses, New York: Marecel dekker. ISBN 0824769139.

Elsanhoty RM. Salam SA. Ramadan MF. Badr FH. 2014. Detoxification of aflatoxin M1 in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. *Food Control.* 43. 129-134

El-Khoury A. Atoui A. Yaghi J. 2011. Analysis of aflatoxin M1 in milk and yogurt and AFM1 reduction by lactic acid bacteria used in Lebanese industry. *Food Control*, 22: 1695-1699.

El-Nezami H. Kankaanpaa P. Salminen S. Ahokas J. 1998. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen aflatoxin B1. *Food and Chemical Toxicology*, 36: 321-326.

El-Nezami H. Mykanen H. Kankaanpaa P. Salminen S. Ahokas J. 2000. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* strains to remove aflatoxin B1 from the chicken duodenum. *Journal of Food Protection*, 63: 549– 552.

Fardos B. Magda M. 2009. Trials towards reduction of fungal growth and aflatoxin G1 production in Arabic coffee using different additivies. *AfricanJournal of Food Science*, 3: 68-76.

Giovati L. Magliani W. Ciociola T. Santinoli C. Conti S. Polonelli L. 2015. AFM1 in milk physical biological and prophylactic methods to mitigate contamination. *Toxins*, 7: 4330-4349.

Hibbett DS. Binder M. Bischoff JF. Blackwell M. Cannon PF. Eriksson OE. Huhndorf S. James T. Kirk PM. 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycological Research*, 111: 509-547.

Kabak B. Brandon EFA. Var I. Blokland M. Sips AJAM. 2009. Effects of probiotic bacteria on the bioaccessibility of aflatoxin B1 and ochratoxin A using an in vitro digestion model under fed conditions. *Journal of Environmental Science and Health*, Part B, 44: 472-480.

Lehmann HR. Dolle E. Zettier KH. 1991. Centrifuges for milk clarification and bacterial removal. In H. G. Kronchen, & V. Belting, Westfalia Separator Technical Scientific Documentation, No. 12, (pp. 1- 40).

Mahesh, B. K. and Devegowda, G. 1996, Ability of aflatoxin binders to bind aflatoxin contaminated poultry feeds and liquid media *in vitro*, in poster presented at the 12th Annual Symposium on Biotechnology in the feed industry, Lexington, Virginia.

Masoero F. Gallo A. Diaz D. Piva G. Moschini M. 2009. Effects of the procedure of inclusion of a sequestering agent in the total mixed ration on proportional aflatoxin M1 excretion into milk of lactating dairy cows. *Animal Feed Science and Technology*, 150: 34-45.

Magnoli AP. Rodriguez MC. González Pereyra ML. Poloni VL. Peralta MF. Nilson AJ. Miazzo RD. Bagnis G. Chiacchiera SM. Cavaglieri LR. 2017. Use of yeast (*Pichia kudriavzevii*) as a novel feed additive to ameliorate the effects of aflatoxin B_1 on broiler chicken performance. *Mycotoxin Research*, 33(4): 273-283.

MoreiradaSilva JF. Peluzio JM. Prado G. CruzMadeira JEG. OliveiraSilva M. De Morais PB. Rosa CA. Pimenta RS. Nicoli JR. 2015. Use of probiotics to control aflatoxin production in peanut grains. *The Scientific World Journal*, 959(138): 1-8.

Mahesh BK. Devegowda G. 1996, Ability of aflatoxin binders to bind aflatoxin contaminated poultry feeds and liquid media *in vitro*, In poster presented at the 12th Annual Symposium on Biotechnology in the feed industry, *Lexington*, *Virginia*.

Pierides M. El-Nezami H. Peltonen K. Salminen S. Ahokas J. 2000. Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind aflatoxin M1 in a food model. *Journal Food Protection*, 63: 645–650.

Rahaie s. Emam-Djomeh z. Razavi SH. Mazaheri M. 2010. Immobilized *Saccharomyces Cerevisiae* as a potential aflatoxin decontaminating agent in pistachio nuts. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41. 82-90

Sieuwerts S. De Bok FAM. Mols E. de Vos WM. Van Hylckama Vlieg JET. 2008. A simple and fast method for determining colony forming units. *Letters in Applied Microbiology*, 47: 275-278.

Selma MV. Martinez-culebras A. Aznar PV. 2008. Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. *Journal of Food Microbiology*, 122: 126-134.

Shetty PH. Hald B. Jespersen L. 2007. Surface binding of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cervisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, 113(1): 41-46

Shetty PH. Jespersen L. 2006. *Saccharomyces cervisiae* and *lactic acid bacteria* as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science and Technology*, 17: 48-55.

Thathana MG. Murage H. KingAbia AL. Pillay M. 2017. Morphological characterization and determination of aflatoxin-production potentials of *aspergillus flavus* isolated from maize and soil in Kenya. *Agriculture*, 7(80): 1-14.

Wang H. Lei Y. Yan L. Wan L. Ren X. Chen S. Dai X. Guo W. Jiang H. Liao B. 2016. Functional genomic analysis of *Aspergillus flavus* interacting with resistant and susceptible peanut. *Toxins*, 8(46): 1-16.

Zhou G. Chen Y. Kong Q. Yunxiao M. Liu Y. 2017. Detoxification of Aflatoxin B1 by *Zygosaccharomyces rouxii* with Solid State Fermentation in Peanut Meal. *Toxins*. 9. 42. 1-9.

Zhuang Z. Lohmar JM. Satterlee T. Cary JW. Calvo AM. 2016. The master transcription factor *mtfA* governs aflatoxin production morphological development and pathogenicity in the fungus *Aspergillus flavus*. *Toxins*, 8(29): 1-16.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 15, No. 4, Oct- Nov 2019, p. 441-452

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد 15، شماره 4، مهر - آبان 1398، ص. 452-441

The effect of some species of yeasts on reduction of aflatoxin B1 of *Aspergillus flavus* in simulated model of human stomach

S. Bahram vand [1], S. Mohammadi[2*]

Received: 2018.08.14
Accepted: 2019.03.16

Introduction: AFB1 is a highly carcinogenic secondary metabolite of some species of *Aspergillus*. Recently, use of microorganisms has been increased to reduce the absorption of mycotoxins in gastrointestinal tract. So, in this study the effect of the three yeasts *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia fermentans*, and *Rhodotorula mucilaginosa* on reduction of AFB1 in a simulated model of human stomach was investigated.

Materials and methods: At first, *A. flavus* was isolated and then were purified. Then, AFB1 was produced in PDB media and presence of AFB1 was determined by blue fluorescence radiation under UV light. Toxin was extracted using the method of solvation in chloroform and injected into HPLC and the final concentration was 49 $^{ng}/_{ml}$. The simulated stomach was contaminated with 0.1 ml samples of AFB1 of three concentrations: 0.25 $^{ng}/_{ml}$ and 0.50 $^{ng}/_{ml}$ from standard AFB1 and also 49 $^{ng}/_{ml}$ from the *A. flavus* under study. Then the yeasts were added and the mixture was incubated. After sampling at 0 and 120 minutes, the samples were centrifuged. The supernatants were separated to determine the concentration of residual toxin by direct competitive ELISA method. The experiment was conducted in a completely randomized design with a factorial experiment. The three factors included yeast (four levels: three yeasts and non-yeast treatments), concentration (four levels: 0, 0.25, 0.50 and 0.49 $^{ng}/_{ml}$) and time (two levels: 0 and 120 min). The whole experiment was carried out 3 times.

Results & ddiscussion: The results showed that all three yeasts had the ability to reduce the toxin in the stomach compared to the control treatment (without yeast), but the effect of *R.mucilaginosa* was more significant than the other two. The lowest toxin concentration in supernatant was observed at 0.25 $^{ng}/_{ml}$. Over time, toxin concentration in supernatant decreased. The interaction of yeasts and toxin concentration showed that in comparison with the control, at each three concentrations, all three yeasts could reduce toxin concentration. The minimum toxin concentration in supernatant was obtained at 0.25 $^{ng}/_{ml}$ in the presence of *R.mucilaginosa*. The results of interaction of yeast×time showed that after both 0 and 120 minutes, all three yeasts were able to reduce the toxin and the minimum toxin concentration was observed after 120 minutes for *R.mucilaginosa*. The results of interaction of time and toxin concentration in the model showed that at 0.25 $^{ng}/_{ml}$ toxin concentration was at the lowest level after 120 minutes. The results of interaction of yeast×time×toxin concentration showed that the lowest toxin concentration was related to *R.mucilaginosa* after 120 minutes at 0.25 $^{ng}/_{ml}$. To conclude, the results of this study showed that all three yeasts had the ability to reduce AFB1 in the simulated model of human stomach, but *R.mucilaginosa* can be introduced as the most efficient isolate in biocontrol of AFB1.

Keywords: *Aspergillus flavus*, aflatoxin B1, yeast, simulated model of human stomach

1. Former MSc students of Microbiology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
Saharrr.7293@gmail.com, 09171163570
2. Assistant professor of plant pathology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran
(* Corresponding author E-mail: mohammadi.pp@gmail.com)